

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Basel
Direktor: Prof. Dr. F. Verzár

Einfluß der Thymektomie auf die Empfindlichkeit von Ratten gegenüber A und D Vitamin-Mangel

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Otto Vogt

von Allschwil Bld.

Bern 1948

MEDIZINISCHER VERLAG HANS HUBER, BERN

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Basel

Direktor: Prof. Dr. F. Verzár

Einfluß der Thymektomie auf die Empfindlichkeit von Ratten gegenüber A und D Vitamin-Mangel

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Otto Vogt

von Allschwil Bld.

Bern 1948

MEDIZINISCHER VERLAG HANS HUBER, BERN

Die Arbeit erscheint in der Internationalen Zeitschrift für Vitamin-
forschung, Verlag Hans Huber, Bern, Band XX, Heft 1, 1948.

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Herrn Professor F. Verzár.
Tag der Promotion: 13. Februar 1948.



Alle Rechte vorbehalten
Copyright by Verlag Hans Huber, Bern 1948
In der Schweiz gedruckt — Imprimé en Suisse — Printed in Switzerland
Druck : Alfred Schmid & Cie., Bern

Einfluß der Thymektomie auf die Empfindlichkeit von Ratten gegenüber A und D Vitamin-Mangel**

Nach Exstirpation des Thymus bei jungen Hunden sah *B a s c h* (1906, 1910, 1913) ¹ Knochenveränderungen auftreten, die den Eindruck einer Rachitis machten. *B a s c h* selbst hielt diese Störungen der Verknöcherung zwar für etwas verschieden von Rachitis. Spätere Untersucher sprachen sich aber trotzdem dafür aus. Seine Untersuchungen wurden besonders von *R a n z i* und *T a n d l e r* (1909) ² bestätigt. *K l o s e* und *V o g t* (1910) ³ setzten diese Versuche fort. Auch sie fanden Knochenschwäche und rachitisähnliche Veränderungen, die als «ein spezifisches, thymektogenes Knochenleiden» beschrieben wurden. *M a t t i* (1913) ⁴ hat ebenfalls Skelettmisbildungen und Kalkarmut der Knochen bei jungen Hunden nach Thymektomie beschrieben.

A s h e r und *L a n d o l t* (1934) ⁵ sahen bei «vitaminarmer» Ernährung der Ratten nach Thymusexstirpation ein wesentlich geringeres Wachstum, verglichen mit ebenso ernährten Normaltieren und eine Verschmälerung der Knorpelwucherungszone. Sie sahen darin eine Bestätigung der Versuche der oben erwähnten. Andererseits hat aber *A s h e r* mit seinen Mitarbeitern ⁶ (*R a t t i*, 1930) ⁷ mit Fütterung von getrocknetem Thymuspulver eine Förderung des Wachstums gesehen. Er stellte auch einen Azeton-Äther-Extrakt her, der Thymocrescin genannt wurde und von dem nach weiterer Reinigung bereits 1 mg pro Tag, jugendlichen Ratten injiziert, eine deutliche Wachstumsförderung ergab. *A s h e r*s Mitarbeiter, *N o w i n s k i* (1930) ⁸, machte jedoch die einschränkende Beobachtung, dass Thymocrescin-Extrakte nur dann wachstumsfördernd wirken, wenn die Tiere Vitamin A-arm ernährt werden. Thymocrescin selbst soll keine Vitamine enthalten. Diese Untersuchungen sind zwar von *S e g a l o f f* und *N e l s o n* (1940) ⁹ nicht bestätigt worden. Sie könnten aber möglicherweise eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Mangel an Vitamin A zur Erklärung haben.

Besonders grosses Aufsehen erregten im Jahr 1937 die Versuche von *E i n h o r n* und *R o w n t r e e* ¹⁰, die bei Ratten den Thymus in 6 sukzessiven Generationen zwischen dem 17. und 21. Tag exstirpierten. Von Generation zu Generation trat in zunehmendem Mass eine Entwicklungs- und Wachstumsstörung auf, die schliesslich zu Zwerggeburten führte.

** Ausgeführt mit Unterstützung des Eidg. Arbeitsbeschaffungskredits zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

Merkwürdigerweise konnten diese Befunde trotz mehrfacher Nachuntersuchung nicht wiederholt werden. Chiodi (1939)¹¹ sah an 5 sukzessiven Generationen keine Entwicklungsstörungen, ebensowenig Reinhardt (1940)¹², Segaloff und Mitarbeiter (1940)⁹ sowie Turpin (1941)¹³ und schon Anderson (1932)¹⁴.

Es ist, soweit wir wissen, nie versucht worden, eine Erklärung dafür zu finden, wie es zu diesen auffallenden Befunden von Einhorn und Rowntree gekommen ist. Es schien uns möglich, dass es sich auch hier um Folgen verschiedener Nahrung gehandelt hat. Die Nahrung von Einhorn und Rowntree war sehr hochwertig, besonders an Eiweiss, und es konnte daran gedacht werden, dass mit verschiedener Nahrung die Versuche eventuell Unterschiede ergeben.

Auf Grund dieser Widersprüche der Literatur und nachdem es bisher noch nie einwandfrei gelungen ist, charakteristische Ausfallerscheinungen nach Exstirpation des Thymus nachzuweisen, wurde beschlossen, eine Kontrolluntersuchung an Tieren von 4 sukzessiven, thymektomierten Generationen durchzuführen und zu prüfen, ob die thymektomierten Tiere empfindlicher gegenüber dem Mangel an Vitamin A und Vitamin D sind.

Versuche

Wir haben diese Frage an Ratten untersucht. Der Thymus wurde am 15. bis 21. Lebenstag nach der Methode von Rowntree⁶ exstirpiert. Wir haben das bisher in 4 fortlaufenden Generationen durchgeführt.

Erste Generation, geb. 19.—22. November 1945.

Zweite Generation, geb. 26. April bis 21. Mai 1946

Dritte Generation, geb. 5.—7. Oktober 1946.

Vierte Generation, geb. 4. März bis 2. April 1947.

Alle Tiere entstammen der seit 2 Jahrzehnten reingezüchteten Institutionszucht, und die Kontrollen waren auf dem üblichen Zuchtfutter gehalten.

Bei diesen wurde die Entwicklung der Haare, Zähne, Ohren, Augen und das Körperwachstum usw. beobachtet, ohne dass bisher Unterschiede der Entwicklung gegenüber normalen Tieren nachgewiesen wurden. Diese Versuche über die Entwicklung der Tiere, die inzwischen bereits 6 Generationen umfassen, werden noch fortgeführt. Darüber wird vom Institut aus später noch eingehend berichtet werden.

I. Vitamin D-Mangel:

30 thymektomierte Albino-Ratten der dritten thymektomierten Generation und 30 normale Kontrolltiere gleichen Alters wurden am 40. Lebenstag auf Vitamin D-freie Diät gesetzt und im Dunkeln unter sonst gleichen Bedingungen gehalten. Die D-freie Nahrung bestand aus:

Glutein extrahiert	15,0 %
Weizen gemahlen	30,0 %
Maismehl	33,0 %
Gelatine	15,0 %
Kalziumkarbonat	6,0 %
Kochsalz jodiert	1,0 %
Wasser pro 100 g Trockenfutter	120 cc.

Anfangsgewicht von 16 normalen ♂ und 14 ♀ 37,9 g.

Von 12 ♂ und 18 ♀ thymektomierten Tieren 37,2 g.

Nach 25 Tagen wurden in Chloräthylnarkose Röntgenbilder der hinteren Extremitäten aufgenommen und die proximale Epiphysenfuge der Tibia als Kriterium einer Rachitis untersucht. Eine zweite Aufnahme wurde am 32. Tag gemacht. Die Rachitis wird in 4 Graden bezeichnet, wobei 1 der stärkste Grad ist. *

Im Alter von 90 Tagen wurden alle normalen und alle thymektomierten Tiere durch Genickschlag getötet. Bei der Sektion fanden sich bei 2 männlichen Tieren unbedeutende Thymusreste von 7—12 mg Gewicht. Das mittlere Gewicht der normalen Kontrollen war am 90. Lebenstag 68,5 g, der thymektomierten 67,1 g. Die Differenz ist nicht signifikant.

An denselben Tieren bestimmten wir auch noch das Gewicht von Testis, bzw. Uterus zusammen mit Tuba und Ovarien, ferner Nebennieren und Thymus. Wie Tabelle I zeigt, sind keine Unterschiede vorhanden.

Tabelle I. (D-Avitaminose)

Art	Zahl	Körpergew. g	Testes mg	Uterus etc. mg	Nebennieren mg	Thymus mg
normal ♂	16	75,0 ± 14,9	1416 ± 291	—	19,4 ± 3,3	95,4 ± 48,9
normal ♀	14	62,1 ± 16,1	—	53,8 ± 15,8	18,9 ± 3,8	98,0 ± 51,7
thymekto- miert ♂	12	68,9 ± 8,3	1206 ± 283	—	19,8 ± 3,5	—
thymekto- miert ♀	18	65,3 ± 7,4	—	48,8 ± 8,4	18,7 ± 2,3	—

* Wir danken Herrn P.-D. Dr. O. Wiss von der Vitaminstation für die Hilfe bei den Röntgenaufnahmen und ihrer Auswertung.

Wie die folgende Tabelle II zeigt, waren bei den normalen Tieren ebensoviele Prozente der verschiedenen Rachitis-Grade vorhanden, wie bei thymektomierten. Es liess sich demnach *keine grössere Empfindlichkeit der thymektomierten Ratten gegenüber den normalen Tieren auf Mangel an Vitamin D nachweisen.*

Tabelle II

Art	Zahl	Tag der Vitamin D-freien Ernährung	Rachitisgrade % der Fälle			
			1.	2.	3.	4.
normal	30	25	30,0	43,3	16,7	10,0
		32	53,3	36,7	6,7	3,3
thymektomiert	30	25	26,7	36,7	20,0	16,7
	*	32	50,0	42,3	3,8	3,8

* nur 26 Tiere.

II. Vitamin A-Mangel:

I. Serie

Es wurden zwei verschiedene Serien gemacht. Das Vitamin A-freie Futter bestand aus: Casein extrahiert 18⁰/₀, Stärke 54⁰/₀, Kokosfett 13⁰/₀, Salzgemisch nach MacCollum 5⁰/₀, Hefe 10⁰/₀ sowie Vigantol- und Cholinhydrochlorid-Zusatz.

In der I. Serie wurden 8 ♂ Tiere der zweiten thymektomierten Generation mit Vitamin A-freiem Futter ernährt und zur Kontrolle 8 ebenso alte ♂ normale Tiere benützt. Die Fütterungsversuche begannen bei einem Körpergewicht von 30 g im Alter von etwa 4 Wochen.

Bei den normalen Tieren trat ein Wachstumsstillstand im Mittel am 64. Tag bei einem Körpergewicht von 162 g ein. Bei den thymektomierten Tieren stand das Wachstum im Mittel am 72. Tag und ebenfalls bei 162 g still.

Nachdem ausgesprochener Wachstumsstillstand eingetreten war, wurde in verschiedenen Zeitpunkten zu der Diät täglich 100 E Vitamin-A-Konzentrat zugesetzt. Dieses erhielten wir von der Vitamin-Station der Universität Basel, der wir unsern besten Dank aussprechen.

Von den normalen Tieren starben 2 am 132., bzw. 138. Tag. Von den thymektomierten Tieren ebenfalls 2 am 63., bzw. 90. Tag. Alle andern wurden durch die Vitamin A-Zufuhr geheilt. Das Wachstum setzte sofort wieder ein, Augen- und Hauterkrankungen sowie Lähmungserscheinungen heilten aus. Am 210. Lebenstag erreichten die Normaltiere im Mittel 214 g und die thymektomierten Tiere 230

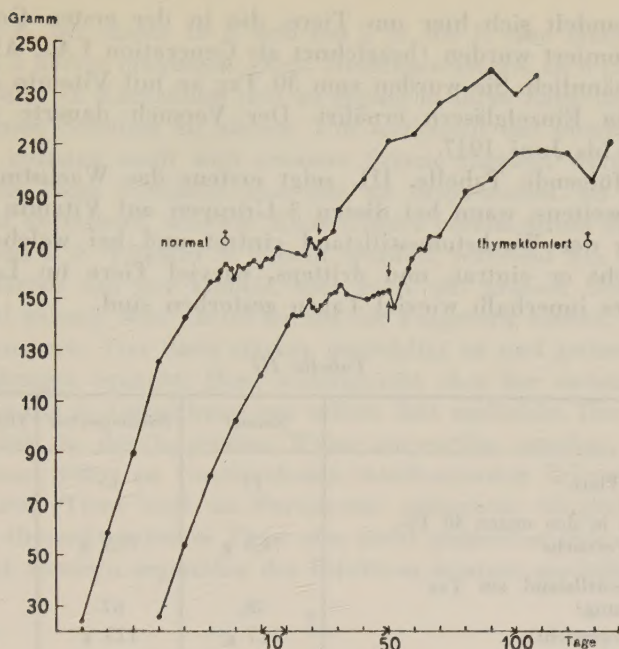


Abb. 1 Zwei Beispiele für Vitamin A-Mangel

Normal: (Nr. 16) 21. XI. 1946

Thymektomiert: (Nr. 3) 20. XI. 1946

↑ = Beginn der Zufütterung von 100 E/Tag Vitamin A.

Gramm Körpergewicht. Dieses schwankte bei den normalen zwischen 182 bis 250 g, bei den thymektomierten zwischen 192 und 250 g. Als Beispiel führen wir die Gewichtskurve eines thymektomierten und eines normalen Tieres an. (Abb. 1) Die Pfeile zeigen den Tag an, von welchem täglich 100 E Vitamin A-Konzentrat zugesetzt wurde und Heilung eintrat.

II. Serie

Um zu untersuchen, ob auch bei Tieren, deren Junge keine Reserven an Vitamin A erben, dieselben Resultate zu erhalten sind, haben wir Tiere thymektomiert, deren Mütter schon vor und während der ganzen Gravidität auf A-armer Diät gezüchtet waren, um sie für Vitamin-A-Titrationsen besonders geeignet zu machen. Von diesen Tieren wurden 18 im Alter von 18—21 Tagen thymektomiert; bei 14 weiteren Tieren wurde gleichzeitig eine Scheinoperation ausgeführt (Spaltung des Sternums, des Musculus sternohyoideus und damit Freilegung des Thymus) und 18 kamen normal in den Versuch.

Es handelt sich hier um Tiere, die in der ersten Generation thymektomiert wurden (bezeichnet als Generation I A). Alle Tiere waren männlich. Sie wurden vom 30. Tag an mit Vitamin A-freiem Futter in Einzelgläsern ernährt. Der Versuch dauerte vom 21. Februar bis Juni 1947.

Die folgende Tabelle, III, zeigt erstens das Wachstum dieser Tiere, zweitens, wann bei diesen 3 Gruppen auf Vitamin A-freier Nahrung der Wachstumsstillstand eintrat und bei welchem Körpergewicht er eintrat, und drittens, wieviel Tiere im Laufe des Versuches innerhalb wieviel Tagen gestorben sind.

Tabelle III

	Normal	Scheinoperiert	Thymektomiert
Zahl der Tiere	17	15	18
Wachstum in den ersten 40 Tagen des Versuchs	74,5 g	71,7 g	70,9 g
Wachstumsstillstand am Tag der Fütterung:	58.	67.	63.
bei Körpergewicht:	117 g	115 g	117 g
Gestorben innerhalb 100 Tagen bei A-freier Fütterung:	10	3	7
Zwischen Tagen:	46—100	46—99	65—92

Es ergibt sich, dass der Wachstumsstillstand auch bei diesen Tieren etwa um die gleiche Zeit, jedoch bei etwas geringerem Körpergewicht als in der ersten Serie eintrat. Auch hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied, weder im Zeitpunkt, noch im Körpergewicht zwischen den drei Gruppen.

In dieser Serie erkrankten relativ viel Tiere an interkurrenten Krankheiten, speziell an Pneumonie. Von den 32 Tieren der normalen und scheinoperierten Gruppe starben 13 Tiere zwischen dem 46. und 100. Tag der Avitaminose. Von den 18 thymektomierten 7 Tiere auch zwischen dem 65. und 92. Tag, also der gleiche Prozentsatz von 40%. Es ist demnach mit voller Sicherheit bewiesen, dass die thymektomierten Tiere keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Vitamin A-Mangel haben.

Es wurden nun *Heilungsversuche* an den A-avitaminotischen Tieren aller drei Gruppen versucht. Von 4 normalen und 8 scheinoperierten Tieren wurden 7 bereits durch 2 E Vitamin A geheilt, 4 überhaupt nicht und gingen wahrscheinlich an der interkurrenten Krankheit ein, eines konnte mit 100 E gerettet werden. Von den thymektomierten Tieren untersuchten wir 6. Nur bei einem

hatten 2 E, bei einem 10 E und bei 3 je 100 E eine Heilwirkung, während 3 übrige eingingen. Diese Heilungsversuche an 6 thymektomierten und 12 Kontrollen sind zu gering in ihrer Zahl, um daraus weitgehende Schlüsse zu ziehen. Um statistisch das bearbeiten zu können, müssten noch weit grössere Serien angelegt werden. Wir betrachten diese Versuche also nur als orientierend. Es ist aber doch sehr auffallend, wieviele Kontrolltiere bereits durch die kleine Menge von 2 E Vitamin A geheilt wurden, während bei den thymektomierten das nur einmal, und auch mit grossen Dosen, nur je einmal gelang. Man dürfte daraus die Folgerung ziehen, dass das thymektomierte Tier doch stärker geschädigt ist und grössere Vitamin A-Mengen braucht. Dem widerspricht aber der sichere Nachweis, dass die A-Avitaminose zur selben Zeit ausbricht. Der Befund dürfte eher in der folgenden Weise auswertbar werden: Die A-Avitaminose führt zu verschiedenen interkurrenten Erkrankungen. Die meisten Tiere sind an Pneumonie gestorben. Möglicherweise sind die thymektomierten Tiere also nicht gegenüber dem Vitamin A-Mangel, sondern gegenüber der Infektion weniger geschützt.

■

Wir haben versucht, ob eventuell im *normalen Thymus* eine Substanz vorhanden ist, die den Mangel bei diesen Tieren ersetzen kann. Zu diesem Zweck wurden 5 thymektomierte Tiere und 10 Kontrolltiere, davon 6 normale und 4 scheinoperierte, nach Ausbruch der A-Avitaminose täglich mit Kalbsthymus gefüttert. Dieser wurde sofort nach der Schlachtung in flüssiger Kohlensäure gefroren, zerkleinert und täglich von dem aufgetauten Material den meisten Tieren 1 g, einigen 0,5 g gefüttert. Die Wirkung von 1 g war immer vorhanden, von 0,5 g hat sie in mehreren Fällen gefehlt. Nachdem aber zu wenig Fälle für diese zwei Dosierungen zur Verfügung stehen, besprechen wir sie alle zusammen.

Von den 5 thymektomierten wurden 4 geheilt, von den 10 Kontrollen (normal und scheinoperiert) 7. Es ist möglich, dass die Nichtgeheilten durch die interkurrente Pneumonie getötet wurden. Jedenfalls ist aber auffallend, wie gross die Heilwirkung der Thymusfütterung war. Von gesamt 15 Fällen 11mal. Zweierlei ist möglich. Entweder ist Kalbsthymus sehr reich an Vitamin A oder aber enthält Thymus eine Substanz, die bei vermehrter Zuführung den Zustand der Tiere wesentlich bessert.

Diskussion

Zusammenfassend können wir feststellen, dass bei 30 thymektomierten Ratten sowohl nach 25 wie 32 Tagen in derselben Prozentzahl der Fälle sich dieselben Grade rachitischer Erkrankung auf Vitamin D-freier Nahrung gezeigt haben. Eine Überempfindlichkeit der Thymektomierten bestand nicht.

Bei 8 thymektomierten Tieren der 2. Generation und bei 18 Tieren einer 1. Generation, wo die Muttertiere schon Vitamin A-arm waren, erkrankten die Tiere auf einer Vitamin A-freien Nahrung beim gleichen Gewicht und Alter wie normale.

Heilungsversuche zeigten möglicherweise einen etwas vermehrten Bedarf an Vitamin A, um eine Heilwirkung zu erhalten. Von 6 thymektomierten Tieren konnten 3, von 12 normalen, bzw. scheinoperierten Tieren, 8 geheilt werden.

Es ist uns aufgefallen, dass die normalen Tiere relativ geringe Vitamin A-Dosen zur Heilung gebraucht haben. Doch ist die Anzahl der Versuche nicht genug, um daraus auf wesentliche Unterschiede zu folgern. Die gleichzeitige Erkrankung scheint uns vielmehr für eine gleiche Empfindlichkeit von normalen und thymektomierten Tieren zu sprechen.

Zusammenfassung

1. Ratten wurden im Alter von 15 und 21 Tagen thymektomiert. Auf Vitamin D-freiem Futter entstanden die rachitischen Erkrankungen im selben Ausmass und zur selben Zeit wie bei den normalen Kontrollen.

2. Auf Vitamin A-freiem Futter zeigten thymektomierte, scheinoperierte und normale Ratten zur gleichen Zeit Wachstumsstillstand. Ein Unterschied liess sich auch bezüglich der Empfindlichkeit auf Vitamin A-Mangel nicht nachweisen.

Herrn Professor Verzár möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen für die Zuweisung der Arbeit und ihre Förderung durch seine wertvollen Ratschläge. Ebenso danke ich Herrn PD. Dr. O. Wiss von der Vitaminstation für die grosszügige Überlassung von titrierten Vitaminkonzentraten und die Hilfe bei den Röntgenaufnahmen und ihrer Auswertung.

Literatur

1. *Basch, K.*, Jahresb. f. Kinderheilk. 1906, 64, 289; 1910, 68, 668. Zschr. f. exp. Pathologie 1913, 12, 180. — 2. *Ranzi, E., Tandler, J.*, Wiener Klin. Wschr. 1909, 27. — 3. *Klose, H., Vogt, H.*, Beitr. z. Klin. Chirurgie 1910, 69, 1. — 4. *Matti, H.*, Erg. d. inn. Med. 1913, 9, 1. — 5. *Asher, L. & Landolt, E.*, Pflügers Arch. 1934, 234, 604. — 6. *Asher, L. & M.*, Biochem. Z. 1932, 234, 1; 1932, 252, 309; 1932, 253, 137; 1933, 257, 209; 1934, 268, 272. — 7. *Ratti, P.*, Biochem. Z. 1930, 223, 100. — 8. *Asher, L. & Nowinski, W.*, Biochem. Z. 1930, 226, 415. — 9. *Segaloff, A. & Nelson, W.*, Am. J. Physiol. 1940, 130, 671. — 10. *Einhorn, N. H. & Rowntree, L. G.*, Endocrinology 1937, 21, 659. — 11. *Chiodi, Ch. O.*, C. R. Soc. Biol. 1939, 130, 298. — 12. *Reinhardt, W. O.*, Proc. soc. exp. Biol. Med. 1940, 43, 732. — 13. *Turpin, R. & M.*, Presse Med. 1941, 353. — 14. *Anderson, D. H.*, J. Physiol. 1932, 74, 49, 207. — 15. *Rowntree, L. G. & M.*, J. Amer. Med. Ass. 1934, 103, 1425; Arch. Int. Med. 1935, 56, 1; Science 1934, 80, 274; 1937, 86, 10; Endocrinology 1936, 20, 342; 1938, 22, 342; 1938, 23, 581.

